使用に際してはこの添付文書をよくお読みください。
また、必要な時に読めるように保管しておいてください。

RS05T1　　※2008年2月改訂（第2版）
体外診断用医薬品　　2006年2月改訂（新様式第1版）

製造販売承認番号：21500AMY00011000

Ｍａｊｏｒ　*ｂｃｒ－ａｂｌ*　ｍＲＮＡキット

DNAプローブ「FR」Amp－CML

血球成分より抽出した ＲＮＡからのMajor *bcr-abl* mRNA測定用

（増幅／酵素／プローブセット）

■全般的な注意

※1. 本キットは体外診断用であるため、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 本キットはＤＮＡプローブ「ＦＲ」Ａｍｐ－ＣＭＬ（スタンダード／プライマーセット）と合わせてご使用ください。
3. 本キットをご使用になる前に、本添付文書および別包装のＤＮＡプローブ「ＦＲ」Ａｍｐ－ＣＭＬ（スタンダード／プライマーセット）に挿入されている添付文書をよくお読みください。
4. 添付文書に記載されている操作方法を守ってください。この操作方法以外の方法による測定値の信頼性は保証いたしかねます。
5. 検体には血液を用いますので、感染の恐れがあるものとして取扱ってください。測定操作にはディスポーザブル手袋、保護メガネなどを着用し、必要に応じて安全キャビネット内で操作してください。検体が手袋などに付着した場合はただちに新しいものに取りかえてください。
6. 試薬が誤って目や口に入った場合または皮膚に付着した場合には、ただちに水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
7. 人体への投与は出来ません。
8. 増幅およびハイブリダイゼーション操作に自動機器をご使用の場合は、当社指定の自動機器をご使用ください。他の自動機器をご使用になった場合は測定結果の信頼性を保証いたしかねます。なお、これらの自動機器の使用方法については、同機器の添付文書および取扱説明書をご覧ください。
9. 本キットは専用の化学発光測定装置を使用します。他の測定装置をご使用になった場合は測定結果の信頼性は保証いたしかねます。なお、これらの専用装置の使用方法については、同装置に添付の取扱説明書をご覧ください。
10. 測定結果に基づく臨床診断は臨床症状や他の検査結果などから担当医師が総合的に判断してください。

※■形状・構造等（キットの構成）

増幅／酵素／プローブセット（保存温度２～８℃）

	構成試薬名	容量	５０回分
1	増幅試薬 ＡＴＰ、ＣＴＰ、ＧＴＰ、ＵＴＰ ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ	０．７５ｍＬ相当	2瓶
2	酵素試薬 Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ 逆転写酵素（ＭＭＬＶ）	１．５ｍＬ相当	1瓶
3	酵素試薬溶解液	１．５ｍＬ	1瓶
4	オイル	１２ｍＬ	1瓶
5	プローブ試薬溶解液	６ｍＬ	1瓶
6	加水分解液	１５ｍＬ	1瓶
7	ＣＭＬプローブ試薬 〔アクリジニウムエステル標識プローブ〕	６ｍＬ相当	1瓶

測定の際には以下のＤＮＡプローブ「ＦＲ」Ａｍｐ－ＣＭＬスタンダード／プライマーセット（別包装）と合わせてご使用ください。

スタンダード／プライマーセット（保存温度－８０～－２０℃）

	構成試薬名	容量	５０回分
8	ＣＭＬプライマー試薬 Ｔ７プライマー ｎｏｎ－Ｔ７プライマー	１．５ｍＬ	1瓶
9	ＣＭＬ　ＲＮＡスタンダード	０．９ｍＬ	1瓶
10	ＣＭＬ定量試薬	０．９ｍＬ	1瓶

■使用目的

血球成分より抽出したＲＮＡからのMajor *bcr-abl* mRNAの測定
なお、Ｇ－ＢＡＮＤ法等の染色体分析により慢性骨髄性白血病と確定診断された患者を対象とし、治療時の治療効果および再発の発見等のためのモニタリング、造血幹細胞移植時の前処置効果の確認に使用する。

■測定原理

本キットは、血球成分より抽出したＲＮＡを標的とし、核酸増幅法を用いてMajor *bcr-abl* mRNAに特異的なＲＮＡを増幅し、さらに増幅産物に特異的なプローブを用いて検出を行う試薬です。

1. 核酸増幅（ＴＭＡ：Transcription Mediated Amplification）
本キットは、ＲＮＡを標的として、プライマー、酵素（逆転写酵素、ＲＮＡポリメラーゼ）および基質の存在下、途中合成される二本鎖ＤＮＡを介してＲＮＡを増幅するものです。すなわち、Ｔ７プライマーが標的ＲＮＡへハイブリダイゼーションし、逆転写酵素（ＲＴ）により相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を合成、ＲＴのＲＮａｓｅ　Ｈ活性により標的ＲＮＡを分解、続いてプライマーがｃＤＮＡへハイブリダイゼーションし、ＲＴによりプロモーター配列を持つ鋳型二本鎖ＤＮＡが合成されます。この鋳型二本鎖ＤＮＡをもとにＲＮＡポリメラーゼ（ＲＮＡ Ｐｏｌ）の転写反応によりＲＮＡが合成されます。また、増幅産物（ＲＮＡ）は、上記と同様な行程により鋳型二本鎖ＤＮＡとなり、ＲＮＡが合成されます（図1）[1]。

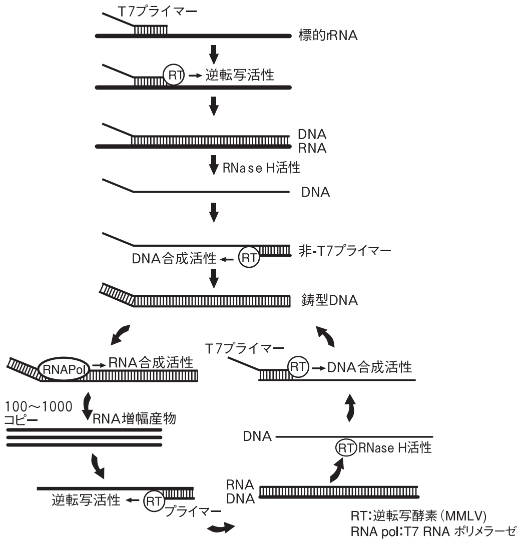

図1．ＴＭＡ増幅原理

2. ハイブリダイゼーションおよび検出（ＨＰＡ：Hybridization Protection Assay）
増幅したＲＮＡ鎖に相補的なアクリジニウムエステル標識一本鎖ＤＮＡプローブを用いて、増幅産物（ＲＮＡ）を検出します。すなわち、増幅終了後の検体とプローブをハイブリダイゼーションさせ、二本鎖のＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドを形成させます。その後、加水分解を行い、ハイブリッドを形成しなかった未反応のプローブのアクリジニウムエステルを失活させます。一方、ハイブリッドを形成したプローブのアクリジニウムエステルは保護されているため加水分解を受けず、化学発光性を保持しています（図2）[2]。
この化学発光の強さ（発光強度）を測定することで、増幅したＲＮＡを検出することができます。
本キットでは各増幅スタンダードの測定値より検量線を作成し、増幅産物測定値より検体中のMajor *bcr-abl* mRNAのコピー数を算出します。

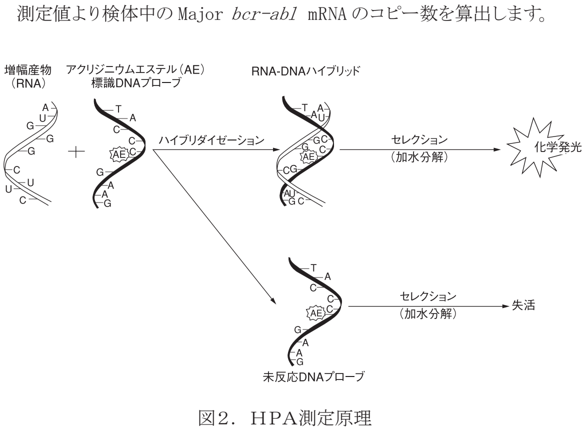

図2．ＨＰＡ測定原理

■操作上の注意

1. 測定試料の性質、採取法

1） 検体採取を行う際には、ＥＤＴＡ－２Ｎａ入り真空採血管にて血液を採取し、転倒混和後ただちに２～８℃にて保存してください。

2） 採血後７２時間以内に全血中の血球成分よりＲＮＡを抽出してください。

2. 妨害物質、妨害薬剤

本キットでは、抽出されたＲＮＡを試料として測定することから、ヘモグロビン、ビリルビンおよび乳びの混入はないと考えられます。従って、妨害物質の測定への影響はないものと考えられます。

3. 交差反応性

表1の腫瘍細胞由来培養細胞株より抽出したＲＮＡ　２５０ｎｇを試料として測定した結果、Ｋ５６２（ＣＭＬ由来細胞株）以外は全て最小検出感度以下となり、交差反応性は認められませんでした。

表1　腫瘍細胞由来の培養細胞株

細胞株名	起源
K562	CML(CML-BC)
Laz221	ALL(Pre-B blast)
BALL-1	ALL(B cell)
MOLT4	ALL
RPMI8420	ALL(T blast)
NALM-16	ALL(Lymphoid precursor)
BALM-1-8AzR	ALL(B cell) 8AzR resistance
CCRF-CEM	ALL(T cell)
HPB-MLT	ALL(T cell)
ML3	AML
HL60	APL（急性前骨髄性白血病）
U937	組織芽球性リンパ腫
PC3	前立腺癌
SKMES-1	肺癌
HT1080	Fibrosarcoma（線維肉腫）
Hela	子宮頸癌
SKBR	乳癌
Lovo	大腸癌
DU145	前立腺癌
SW-620	結腸癌

（注意） 今回用いたＡＭＬ、ＡＬＬ由来細胞株はＰｈ染色体陰性であることを確認しています。

4. 操作上の留意事項

1） 用手法

増幅およびハイブリダイゼーションは温度・時間の影響を受けます。温度・時間管理を厳重に行ってください。

2） 自動機器法

各試薬は試薬量が十分残っていることを確認してから自動機器にセットしてください。

3） 用手法、自動機器法共通

（１）調製後の増幅溶液、酵素溶液、プローブ溶液および溶解後のＣＭＬ定量試薬、ＣＭＬ　ＲＮＡスタンダードの保存は－８０～－２０℃にて行ってください。また、調製後の試薬および溶解後の試薬は、凍結融解を3回以上繰り返さないでください。凍結保存しておいた試薬を使用する場合は、常温にて解凍し、緩やかに混和してから使用してください。

（２）すべての試薬は常温に戻した後に使用してください。試薬に沈殿を認めた場合は緩やかに攪拌して沈殿を完全に溶解してから使用してください。

（３）溶解した増幅溶液、酵素溶液は保存状態により沈殿が析出する場合があります。その際には、常温で攪拌しながら溶解するか、４２℃以下の水浴につけて沈殿を完全に溶解してから使用してください。

（４）プローブ溶液、プローブ試薬溶解液および加水分解液に沈殿が析出している場合には、６５℃の水浴につけて沈殿を完全に溶解してから使用してください。沈殿が溶解していない状態では使用しないでください。

5. その他

1） 感染およびコンタミネーションを避けるため、臨床検体の前処理、検体分注は安全キャビネット内で行ってください。

2） コンタミネーションを避けるため、ＲＮＡ抽出および増幅操作を行う検査室と検出操作を行う検査室に分けてください。検出操作は増幅操作の場所から離れたところで実施してください。
なお、自動機は増幅室に設置してください（Ｄｓ－５０ＨＰＡを除く）。

3） 検査を始める前に有効塩素濃度２．５%に調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液で、ピペット、連続分注器、実験台およびその周辺を拭いた後、イオン交換水で拭いてください。

4） 試験管、ピペット、チップ、水浴、連続分注器などの使用器具は増幅専用のものと検出専用のものに分け、両者を共用で使用しないでください。

5） 検体や増幅スタンダードの分注の際にはコンタミネーションを避けるため、フィルター付チップを使用してください。

6） アッセイを行う際には、ディスポーザブル手袋を着用してください。特に増幅産物や試薬を扱う際には必ず手袋を着用してください。ＣＭＬ　ＲＮＡスタンダード、増幅スタンダードあるいは検体が手袋に付着した場合と思われる際はただちに新しい手袋と交換してください。

7） コンタミネーションの原因となる増幅産物の除去には次亜塩素酸ナトリウム溶液が有効です。使用する器具やキャビネット内は有効塩素濃度２．５%に調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液で拭き、増幅産物を除去してください。

8） 水浴の水は毎回取りかえてください。また、水を取りかえる際には有効塩素濃度２．５%に調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液で機器本体を拭いてください。

9） 測定に必要な試薬類・器具・機器の使用の際には、これらに添付の取扱説明書などをご覧ください。

■用法・用量（操作方法）

1. 試薬の調製法
（試薬の調製法は用手法、自動機器法ともに共通です。）

1） ＣＭＬプライマー試薬、ＣＭＬ　ＲＮＡスタンダードおよびＣＭＬ定量試薬は常温にて融解後、充分混和します。

2） 増幅溶液、酵素溶液の調製

増幅試薬１瓶あたり７５０μＬのＣＭＬプライマー試薬を加えて溶解し、増幅溶液とします。酵素試薬１瓶に１．５ｍＬの酵素試薬溶解液を加えて溶解し、酵素溶液とします。

3） プローブ溶液の調製

増幅反応中に、ＣＭＬプローブ試薬１瓶にプローブ試薬溶解液６．０ｍＬを加え溶解し、プローブ溶液とします。－８０～－２０℃にて保存しておいたプローブ溶液を使用する場合は常温にて解凍し、緩やかに混和します。溶液に沈殿を認めた場合は６５℃で５～１０分間インキュベートし緩やかに攪拌して、**沈殿を完全に溶解してから使用してください。**

4） オイルおよび加水分解液は常温に戻した後、そのまま用いてください。

5） 増幅スタンダードの調製

ＣＭＬ　ＲＮＡスタンダードをＴＥ（注意）で希釈して増幅スタンダードを調製します。

希釈例：測定には増幅スタンダード１～４を用います。

	希釈法	
ＣＭＬ　ＲＮＡスタンダード (5×10^5 copies/assay)	－	－
増幅スタンダード５ (2.5×10^4 copies/assay)	ＣＭＬ　ＲＮＡスタンダード ５０μＬ	ＴＥ　９５０μＬ
増幅スタンダード４ (2500 copies/assay)	増幅スタンダード５　１００μＬ	ＴＥ　９００μＬ
増幅スタンダード３ (500 copies/assay)	増幅スタンダード４　１００μＬ	ＴＥ　４００μＬ
増幅スタンダード２ (100 copies/assay)	増幅スタンダード３　１００μＬ	ＴＥ　４００μＬ
増幅スタンダード１ (0 copy/assay)	－	ＴＥ　５００μＬ

希釈終了後、手袋を新しいものと交換します。

（注意）　ＴＥは、２．必要な機器・器材などを参考に調製してください。

6） ＣＭＬ定量試薬と増幅試薬の混合液の調製（自動機器法のみ）

自動機器法ではあらかじめ、ＣＭＬ定量試薬と増幅試薬の混合液を調製しておきます。1テストあたり、ＣＭＬ定量試薬１５μＬ、増幅試薬２５μＬ（３：5比）のテスト数に機器のデッドボリューム分を合わせた量を調製してください。

2. 必要な器具・器材

機器・器具など	規格など	用手法	自動機器法
水浴	４２℃×1台、６５℃×２台	○	－
試験管ラック	２台	○	○
ラックミキサー	１台	○	－
化学発光測定装置	リーダーHC＋など	○	注）
リーダー用試薬（リーダー用試薬Ⅰ、リーダー用試薬Ⅱ）	別売品	○	○
マイクロピペット	５０μＬ、１００μＬ、４００μＬ、５００μＬ、７５０μＬ、９００μＬ、９５０μＬ分注用	○	－
フィルター付チップ	５０μＬ、１００μＬ、４００μＬ、５００μＬ、７５０μＬ、９００μＬ、９５０μＬ分注用	○	○
フィルター付ロングチップ	５０μＬ分注用（RNA溶液および増幅スタンダード分取用）	○	○
連続分注器／チップ	１５μＬ、２５μＬ、１００μＬ、２００μＬ、３００μＬ分注用	○	－
マイクロ試験管	１．５ｍL用	○	○
ポリプロピレン製試験管	１２ｍｍ×７５ｍｍ	○	○
ディスポーザブルピペット	６ｍＬ分注用	○	○
ディスポーザブル手袋	パウダーフリーのものを用いてください。	○	○
ＴＥ	Tris-EDTA 緩衝液 pH8.0(10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA)：ＲＮａｓｅ ｆｒｅｅの試薬を用いてください	○	○
シーリングカード	別売品	○	－
自動機器	Ｄｓ－５０ＴＭＡ自動機、Ｄｓ－５０ＨＰＡ自動機、その他当社指定の自動機器：別売品	－	○
ＲＮＡ抽出キット	QIAGEN 社製 QIAamp RNA Blood Mini Kit もしくは RNeasy Mini Kit を推奨	○	○

注）　Ｄｓ－５０ＴＭＡ自動機およびＤｓ－５０ＨＰＡ自動機では必要、その他当社指定の自動機器では不要

３. 測定法

1） 用手法での測定の場合

（１）検体採取について

検体採取を行う際には、ＥＤＴＡ－２Ｎａ入り真空採血管にて血液を採取し、転倒混和後ただちに2～8℃にて保存してください。

（２）ＲＮＡの抽出

市販のＲＮＡ抽出キットを用いて採血後７２時間以内に全血中の血球成分よりＲＮＡを抽出してください。なお、操作法につきましてはＲＮＡ抽出キットの取扱説明書に従ってください（QIAGEN 社製 QIAamp RNA Blood Mini Kit もしくは RNeasy Mini Kit を推奨します）。

※（３）ＲＮＡ溶液の調製

検体より抽出したＲＮＡの吸光度を測定し、算出したＲＮＡ濃度より、ＲＮＡをＴＥで希釈し、ＲＮＡ溶液を調製します。

（４）増幅（ＴＭＡ：Transcription Mediated Amplification）

試薬の分注には増幅専用の連続分注器を使用してください。

増幅スタンダードおよびＲＮＡ溶液の分取にはロングチップを使用してください。

① ＣＭＬ定量試薬１５μＬを各試験管の底部に分注します。

② 増幅溶液２５μＬを各試験管に分注します。さらにオイル２００μＬを分注します。

③ 増幅スタンダード1～4、またはＲＮＡ溶液５０μＬを各試験管に分取します。試験管を緩やかに混和します。手袋を新しいものと交換します。

④ シーリングカードでカバーし、６５±1℃の水浴で、１０分間インキュベートします。

⑤ ６５±１℃の水浴から試験管ラックを４２±１℃の水浴に移し、１０分間インキュベートします。

⑥ シーリングカードをとり、**試験管ラックを４２±１℃の水浴に入れたまま、**各試験管に酵素溶液２５μＬを分注します。新しいシーリングカードでカバーし、緩やかに混和します。

⑦ ４２±1℃の水浴で６０分間インキュベートします。

※（注意）　６０分間インキュベート後の試験管は2～8℃で2時間、－２０℃で１週間保存可能です。２～８℃で保存した場合は完全に常温に戻してから（５）へ進みます。なお、－２０℃で保存した場合、４２±1℃の水浴で融解してから（５）へ進みます。

（５）ハイブリダイゼーションおよび検出（ＨＰＡ；Hybridization Protection Assay）

試薬の分注には検出専用の連続分注器を使用してください。

① 増幅が終了した試験管のシーリングカードをとり、各試験管にプローブ溶液１００μＬを分注します。試験管を緩やかに混和します。

② 新しいシーリングカードでカバーし、６５±１℃の水浴に入れ、３０分間インキュベートします。

③ シーリングカードをとり、各試験管に加水分解液３００μＬを分注します。新しいシーリングカードでカバーし、ラックミキサーで１０～２０秒間攪拌します。

④ ６５±1℃の水浴に入れ、１５分間インキュベートします。

⑤ シーリングカードをとり、常温で１０分間冷却します。

⑥ 化学発光測定装置（リーダーHC＋など）にリーダー用試薬1、リーダー用試薬２、各試験管をセットし、発光強度（ＲＬＵ：Relative Light Unit）を測定します。測定前に湿らせたティッシュペーパーまたはペーパータオルで試験管の外側を拭きます。なお、化学発光測定装置につきましては、装置の取扱説明書をご覧ください。

※⑦ 増幅スタンダードの発光強度より図４のような検量線を作成し、その検量線を用いて検体中の Major *bcr-abl* mRNA のコピー数（copies/assay）を算出します。

検体ＲＮＡ量当たりの Major *bcr-abl* mRNA のコピー数（copies/μｇＲＮＡ）を算出する場合は、使用したＲＮＡ濃度に応じて換算します。

（例） ０．５μｇＲＮＡ使用の場合

１００copies/assay →２００copies/μｇＲＮＡ

２μｇＲＮＡ使用の場合

１００copies/assay →５０copies/μｇＲＮＡ

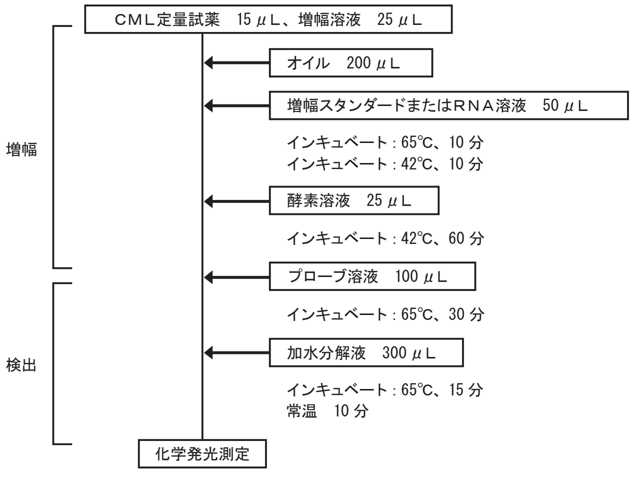

図３．用手法での測定操作法概略図

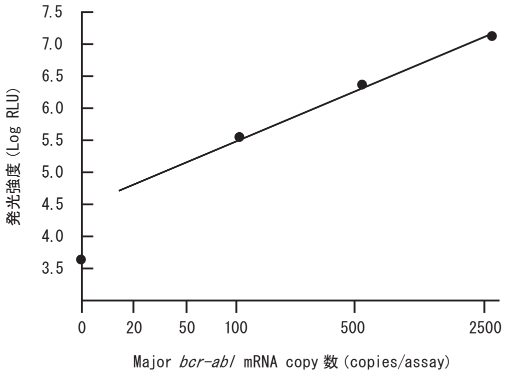

図４．ＤＮＡプローブ「ＦＲ」Ａｍｐ－ＣＭＬ検量線作成例

2） 自動機器での測定の場合

（１）検体採取について

（２）ＲＮＡの抽出

※（３）ＲＮＡ溶液の調製

（上記（１)、（２)、（３）は用手法、自動機器法ともに共通ですので、本添付文書の“３．測定法　1）用手法での測定の場合”に記載した“（１）検体採取について、（２）ＲＮＡの抽出、（３）ＲＮＡ溶液の調製”に従ってください。）

Ｄｓ－５０ＴＭＡ自動機、Ｄｓ－５０ＨＰＡ自動機

（４）増幅（ＴＭＡ：Transcription Mediated Amplification）

自動機器（Ｄｓ－５０ＴＭＡ自動機）につきましては、機器の添付文書および取扱説明書をご覧ください。

自動機器（Ｄｓ－５０ＴＭＡ自動機）に**ＣＭＬ定量試薬と増幅溶液の混合液（３：５比)、**オイルおよび酵素溶液がセットしてあることを確認します。

① ポリプロピレン製試験管（１２×７５ｍｍ）の底部に増幅スタンダード1～4、またはＲＮＡ溶液を各々５０μＬ分取します。

自動機器（Ｄｓ－５０ＴＭＡ自動機）に増幅スタンダード1～4、ＲＮＡ溶液を分取した試験管をセットし、アッセイをスタートさせます。

自動機器により以下の操作が実施されます。

② **ＣＭＬ定量試薬と増幅溶液の混合液（３：５比）**４０μＬの各試験管への分注。

③ オイル２００μＬの各試験管への分注、混和。

④ 各試験管が６５±1℃のヒートブロックに移動、１０分間インキュベート。

⑤ 各試験管が４２±1℃のヒートブロックに移動、１０分間インキュベート。

⑥ 増幅酵素液２５μＬの各試験管への分注。混和。

⑦ 各試験管が４２±1℃のヒートブロックに移動、６０分間インキュベート。

※（注意）　６０分間インキュベート後の試験管は2～8℃で2時間、－２０℃で１週間保存可能です。２～８℃で保存した場合は完全に常温に戻してから（５）へ進みます。なお、－２０℃で保存した場合、４２±1℃の水浴で融解してから（５）へ進みます。

（５）ハイブリダイゼーションおよび検出（ＨＰＡ：Hybridization Protection Assay）

自動機器（Ｄｓ－５０ＨＰＡ自動機）につきましては、機器の添付文書および取扱説明書をご覧ください。

自動機器（Ｄｓ－５０ＨＰＡ自動機）にプローブ溶液、加水分解液および増幅操作が終了した試験管をセットし、アッセイをスタートさせます。

自動機器により以下の操作が実施されます。

① 増幅が終了した各試験管へのプローブ溶液１００μＬの分注、混和。

② 各試験管が６５±1℃のヒートブロックに移動、３０分間インキュベート。

③ 加水分解液３００μＬの各試験管への分注、混和。

④ 各試験管が６５±1℃のヒートブロックに移動、１５分間インキュベート。

以下の操作は用手法での操作と同様です。

⑤ 各試験管を常温で１０分間冷却後、自動機器の試験管ラックから各試験管をはずします。

⑥ 化学発光測定装置（リーダーHC＋など）にリーダー用試薬1、リーダー用試薬２、各試験管をセットし、発光強度（ＲＬＵ：Relative Light Unit）を測定します。測定前に湿らせたティッシュペーパーまたはペーパータオルで試験管の外側を拭きます。なお、化学発光測定装置につきましては、装置の取扱説明書をご覧ください。

その他当社指定の自動機器

（４)、（５）増幅（ＴＭＡ：Transcription Mediated Amplification)、ハイブリダイゼーションおよび検出（ＨＰＡ：Hybridization Protection Assay）

自動機器につきましては、機器の添付文書および取扱説明書をご覧ください。

自動機器に**ＣＭＬ定量試薬と増幅溶液の混合液（３：５比)**、オイル、酵素溶液、プローブ溶液、加水分解液、リーダー用試薬（リーダー用試薬Ⅰ、リーダー用試薬Ⅱ）がセットしてあることを確認します。

① ポリプロピレン製試験管（１２×７５mm）の底部に増幅スタンダード1～4、またはRNA溶液を各々５０μL分取します。
自動機器に増幅スタンダード１～４、RNA溶液を分取した試験管をセットし、アッセイをスタートさせます。
自動機器により以下の操作が実施されます。
② **CML定量試薬と増幅溶液の混合液（３：５比）**４０μLの各試験管への分注。
③ オイル２００μLの各試験管への分注、混和。
④ 各試験管が６５±1℃のヒートブロックに移動、１０分間インキュベート。
⑤ 各試験管が４２±1℃のヒートブロックに移動、１０分間インキュベート。
⑥ 増幅酵素液２５μLの各試験管への分注、混和。
⑦ 各試験管が４２±1℃のヒートブロックに移動、６０分間インキュベート。
⑧ 増幅が終了した各試験管へのプローブ溶液１００μLの分注、混和。
⑨ 各試験管が６５±1℃のヒートブロックに移動、３０分間インキュベート。
⑩ 加水分解液３００μLの各試験管への分注、混和。
⑪ 各試験管が６５±1℃のヒートブロックに移動、１５分間インキュベート。
⑫ 各試験管を常温で１０分間冷却後、発光強度（RLU：Relative Light Unit）を測定。

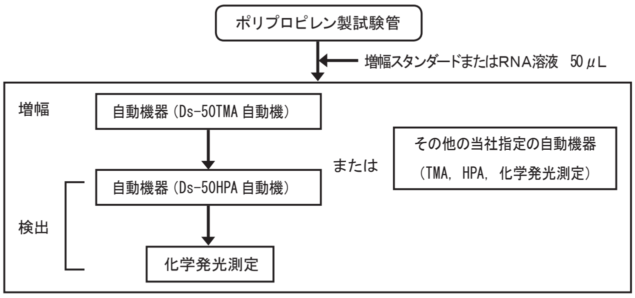

図5．自動機器法での測定操作法概略図

※■測定結果の判定法

1．CML以外の血液疾患の症例［急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、骨髄異形成症候群（MDS）など（表2）］および健常人からの末梢血検体を測定した結果は図6に示すように、全例、最小検出感度以下でした［図6内の測定結果は、５０μL全血 /assay での測定値であり、すべて最小検出感度以下のため、測定値（copies/assay）は参考値です］。

（注意１）本キットで最小検出感度（２０copies/assay）未満と判定された場合でも必ずしも Major *bcr-abl* mRNA の存在を否定するものではありません。臨床診断においては、他の検査結果や臨床所見と併せて総合的に判断してください。

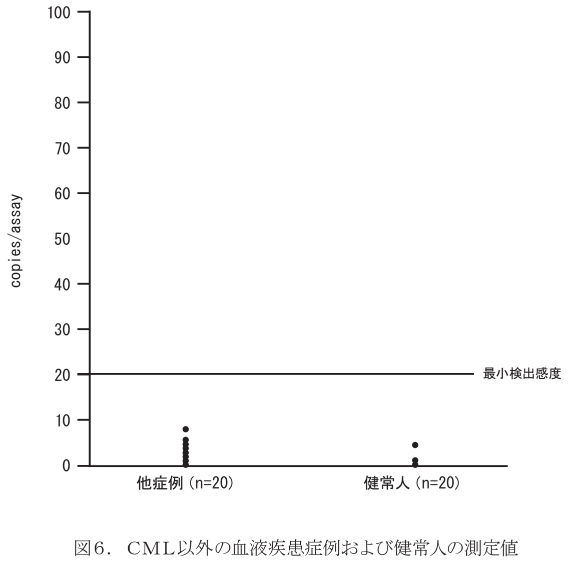

図6．CML以外の血液疾患症例および健常人の測定値

表2　CML以外の血液疾患症例の内訳

疾患名	症例数
MDS（骨髄異形成症候群）	2
CMMoL（慢性骨髄単球性白血病）	1
Atypical CML（非典型的慢性骨髄性白血病）	2
ET（原発性血小板血症）	1
ALL（急性リンパ性白血病）	2
AML（急性骨髄性白血病）	6
多血症	3
血小板増多症	2
CLL（慢性リンパ性白血病）	1

（注意２）本キットでは minor *bcr-abl* mRNA を検出することはできません。サザン分析法などにより *bcr* 遺伝子の再構成を確認し、切断領域が Major-*bcr* であることを確認してください。
（注意３）AMLの一部の症例とALLの５～３０％ではPh染色体が認められるため、CML以外の症例においても本キットの測定値が上昇することがあります。
（注意４）IFNなどによる治療や造血幹細胞移植前の強力な化学療法などで骨髄抑制が激しい場合には、mRNAの発現が抑制される可能性があります。そのため臨床診断においては他の検査結果や臨床所見と併せて総合的に判断してください。

2．健常人からの末梢血検体より抽出した RNA ２μｇを用いて測定した結果は図7に示すように、全例、最小検出感度以下でした［図7内の測定結果はすべて最小検出感度以下のため、測定値（copies/assay）は参考値です］。

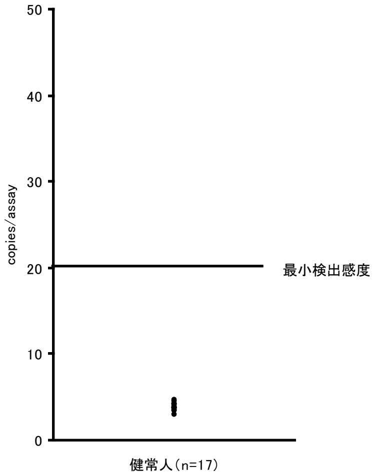

図7．健常人の測定値

■臨床的意義

慢性骨髄性白血病（Chronic Myelogenous Leukemia：CML）は、分化能力を持つ多能性造血幹細胞が腫瘍化し増殖する疾患です。CMLは３０～５０歳代の成人に多くみられ、本邦における年間の新規患者発症頻度は０．５～1人／１０万人で[3]白血病全体の２５％を占めており、欧米に比して高い比率となっています。また慢性白血病のうち、リンパ性と骨髄性の比は1：９であり大多数をCMLが占めています[4,5]。
CMLの血液学的所見としては、１０，０００／μL以上の白血球増多、末梢血中に全段階の骨髄球系細胞の確認、好中球を中心とした白血球数の増大、末梢血好塩基球の絶対数の増加、好中球アルカリフォスファターゼ活性（NAP）の低下、増加した白血球の崩壊による血清ビタミンB 12 の高値化、顆粒球の増加などが認められます。CMLには慢性期（Chronic Phase：CP）、移行期（Accelerated Phase：AP）と急性転化期（Blastic Crisis：BC）の３つの病期があり、通常は診断後約４年半程度で移行期を経て急性転化します。CMLの９５％以上の症例においては Philadelphia（Ph）染色体という染色体異常が認められ、この異常染色体上に形成される *bcr-abl* 融合遺伝子とともに診断を決定づける重要な根拠となっています。Ph染色体とは９番染色体の長腕（9q34）と２２番染色体の長腕（22q11）とが相互転座［t(9;22)（q34;q11)］し、染色体の長腕部が短縮して矮小になった２２番染色体のことです。*bcr-abl* 融合遺伝子は９番染色体の q34 バンドに局在する *c-abl* と呼ばれる癌遺伝子が、２２番染色体の q11 バンドに局在する *bcr* 遺伝子に結合し、形成されたものです。
この融合遺伝子より *bcr-abl* キメラmRNAが転写されます。*c-abl* 遺伝子でコードされる１４５kDaの正常の蛋白は tyrosine kinase 活性をほとんど示しませんが、*bcr-abl* 融合遺伝子でコードされる１９０kDa、２１０kDaの蛋白は強い tyrosine kinase 活性を持つと考えられています。そのため細胞内の情報伝達機構に異常をきたすことでCMLの発症に関与していると考えられています[6,7]。
現在、臨床現場におけるCMLの治療効果の判定には、骨髄液を検体としたG－BAND法[8]によるPh染色体検査およびFISH法[9]による *bcr-abl* 融合遺伝子検査が実施され、IFNなどによる治療効果確認や病態把握、造血幹細胞移植の前処置効果確認、移植後の経過観察および再発の発見が行われています[10]。

しかしながら、G－BAND法およびFISH法はいずれも骨髄細胞を用いた染色体分析であるため、腫瘍化した骨髄細胞を直接分析できるという長所があるものの、骨髄液採取を伴う侵襲度の高い検査であり患者負担も大きいことから頻繁に行うことは困難です。また、検査手法自体も手技に熟練を要する上、検査時間もかかります。さらにはIFN療法や化学療法などによる骨髄抑制のため十分な量の分裂細胞数が得られない場合や、骨髄の脂肪化率が高いことにより十分な骨髄細胞数が得られない場合（高齢者で多く見られる）、さらに骨髄のコラーゲン線維化（Dry Tap）のため骨髄液が採取できない場合には染色体分析を行うことができません。また、造血幹細胞移植においては、移植直後の輸注した造血幹細胞の定着前には、細胞数が少数であり分裂像が得られにくいことから、染色体分析で前処置の効果を確認することは難しいのが実状です。これらの状況から、患者負担の少ない末梢血で検査可能である高感度かつ簡便な方法が求められていました。
本キットは、米国Gen－Probe社で開発された核酸増幅法であるTMAと核酸ハイブリダイゼーションを応用した検出法であるHPAを利用した末梢血中のMajor *bcr-abl* mRNA(注意)測定キットです。本キットはTMA－HPA法を用いることにより、少量の末梢血からMajor *bcr-abl* mRNAを迅速かつ高感度に測定することが可能です。そのため、**G－BAND法などの染色体分析によりCMLと確定診断された患者に対して、**

1）　IFNなどによる治療の治療効果のモニタリング
2）　造血幹細胞移植の前処置効果の確認
3）　再発の発見など治療効果のモニタリング
　［微少残存病変　(Minimal Residual Disease：MRD）検出による移植後の再発有無の確認］
　［移植後再発症例でのドナーリンパ球輸注（Donor Lymphocyte Transfusion：DLT）の効果確認］
　などを従来法よりも負担をかけることなく簡便に行うことが可能になると考えられます。

（注意）　*bcr-abl* 融合遺伝子には *bcr* 遺伝子の切断点によりMajor *bcr-abl* とminor *bcr-abl* の2つのタイプが存在しますが、CMLではほとんどすべての症例でMajor *bcr-abl* 融合遺伝子よりMajor *bcr-abl* mRNAが発現されます。また、本キットではMajor *bcr-abl* mRNAのみが測定可能です。

■性能

1．性能

測定操作法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行うとき、下記の性能を示します。

1）　感度
（1）TE（10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA pH 8.0：Tris-EDTA緩衝液）を試料として測定したとき（0copy／assayに相当する）の発光強度は4．7LogRLU以下です。
（2）CML　RNAスタンダードをTEで希釈して2500copies／assayに調製した溶液を試料として測定したときの発光強度は6．5LogRLU以上です。
2）　正確性
　100、500、1000copies／assay相当の試料を測定するとき、測定値はその表示値の1／2～2倍の値を示します。
3）　同時再現性（併行精度）
　100、1000copies／assay相当の同一試料を3回同時に測定するとき、対数に変換した測定値の変動係数（CV％）は10％以下です。
※4）　測定範囲
　本キットによる血球成分より抽出したRNA中のMajor *bcr-abl* mRNAの測定範囲は20～2500copies／assayです。

※2．臨床性能試験に関する成績

染色体分析によりCMLと確定診断された症例のうちIFN投与により白血球数が10，000／μL以下と血液学的にコントロールされている症例について、G－BAND法によるPh染色体陽性率と本キットの相関性を検討した結果を図8に示します〔本測定結果は50μL全血／assayでの測定値です〕。

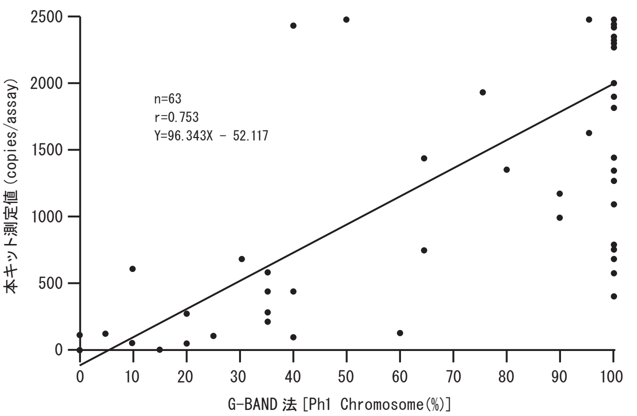

図8．本キット測定値とG-BAND法との相関

3．使用方法（参考）

1）　IFNをはじめとする化学療法における使用方法（参考）
（1）IFNなどにより治療中の慢性期CML患者においては、骨髄検査を補完する目的で2～3ヶ月に1回本キットの測定を行い、Major *bcr-abl* mRNAの発現量を測定することにより治療効果を確認します。
（2）白血球増加の傾向が見られたり末梢血中に芽球が確認されるなど、臨床所見より急性転化が疑われる場合には本キットの測定を行うことにより病態をモニタリングし、必要に応じて骨髄検査で確認します。
2）　造血幹細胞移植における使用方法（参考）
（1）移植前の採取基準
　現在の治療法においては移植に対するIFNの影響を考慮し、移植約1ヶ月前からはIFN投与を中止し移植の準備に入ることから、移植前の測定値として移植約1ヶ月前に検体を採取し、本キットによる測定を行い、移植前処置の効果を確認するコントロールとします。
（2）移植後の採取方法
　造血幹細胞移植後においては、移植した幹細胞の定着なども考慮に入れ、移植約1ヶ月後を目処に採血を開始します。移植後に本キットでの測定値が最小検出感度以下であることを確認することにより前処置の効果を確認します。その後は2～3ヶ月ごとの測定により末梢血でのモニタリングを継続します。

（注意）　以上の使用方法は参考として記載しますが、実際の測定時期は、他の検査結果や臨床所見を含めて総合的に判断し測定を行ってください。

■使用上又は取扱い上の注意

1．取扱い上（危険防止）の注意

1）　検体には血液を使用しますので、HIV、HBV、HCVなどの感染の恐れがあるものとして注意して取扱ってください。アッセイを行う際にはパウダーフリーの手袋を必ず着用し、検体を扱う際には手袋を二重にして操作してください。
2）　採血した試験管は2～8℃で保存し、凍結しないでください。また採血後72時間以内にRNAを抽出してください。抽出したRNAは凍結融解を3回以上繰り返さないでください。
3）　試薬が誤って目や口に入った場合または皮膚に付着した場合は、ただちに水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。

2．使用上の注意

1）　異なる製造番号（外箱に記載）のキットを混合したり、組み合わせて使用しないでください。
2）　使用期限（外箱に記載）の過ぎた試薬は使用しないでください。

3．廃棄上の注意

1）　血液検体の残り、検体が含まれている反応液および検体が付着した可能性のあるチップなどを廃棄する場合は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に基づく感染性廃棄物処理マニュアルに従って処理した後、廃棄してください。
2）　本キットでは核酸増幅を行います。増幅産物が多量に生成されますので、操作後には増幅産物による検査室の汚染を防ぐための処理が必要です。測定終了後の試験管および検体分注に使用したチップなどは有効塩素濃度2．5％に調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液に一晩浸した後、廃棄してください。
3）　試験管ラックは有効塩素濃度2．5％に調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間以上浸した後、水でよくすすぎ、乾燥させてください。
4）　プラスチックおよびガラスの試薬容器は廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。なお、これらの容器を他の目的で使用した場合は、いかなる問題が発生しても責任を負いかねます。

■貯蔵方法・有効期間

1．貯蔵方法

冷蔵保存品（増幅／酵素／プローブセット）　；2～8℃
冷凍保存品（スタンダード／プライマーセット）；－80～－20℃

2．有効期間；12ヵ月

■包装単位

1キット　50回分

別包装：　スタンダード / プライマーセット
1キット　50回分

■主要文献

1．Frank Gonzales et al：Application of transcription-mediated amplification quantification of gene sequences. Gene Quantification, 189-201, 1997
2．岡田　淳ら：感染症ー遺伝子診断と分子疫学ー日本臨床, 50：310-314, 1992.
3．鎌田七男ら（編）：ー血液の癌ー、癌診療 Q&A, 66-67, 1996
4．大野竜三ら（編）：白血病の初発症状と診断の進め方、白血病の種類と概念、白血病の診断、治療 3-21, 1992
5．国立がんセンター中央病院内科レジデント編：14. 白血病、がん診療レジデントマニュアル：127-142, 1995
6．長村（井上）登紀子：10 慢性骨髄性白血病、血液内科学 252-262, 1999
7．Junia V Melo et al.：The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood, Vol.88, No.7, 2375-2384, 1996
8．山田清美：131 G バンド染色法、染色法の全て、Medical Technology 別冊 368-369, 1988
9．高橋　薫ら：間期核ＦＩＳＨ法によるＣＭＬインターフェロン療法の治療効果判定、血液・腫瘍科 34(6) 512-17, 1997
１０．大野竜三ら（編）：Ⅱ治療の流れと選択肢、白血病治療マニュアル 13-18, 1996

※■問い合わせ先

富士レビオ株式会社　お客様コールセンター
TEL：0120-292-832
FAX：03-5695-9234

製造販売元
富士レビオ株式会社
東京都中央区日本橋浜町2-62-5